

## • 论著 •

T 淋巴细胞趋化因子受体 5 表达上调介导了  
肠毒素超抗原对肺动脉内皮的损伤

吴礼襄 萧正伦 孔天翰

**【摘要】** 目的 观察革兰阳性菌肠毒素活化的 T 淋巴细胞(T 细胞)对人肺动脉内皮细胞(HPAEC)的损伤作用,初步探讨其损伤机制。方法 将葡萄球菌肠毒素 B(SEB)活化后的 T 细胞上清加入 HPAEC,检测内皮细胞趋化因子的分泌情况;用 Transwell 小室观察内皮细胞分泌的趋化因子对 T 细胞趋化的影响。用 10 ng/ml SEB 刺激的 T 细胞与 HPAEC 共培养,检测 T 细胞与内皮细胞的黏附率;用原位末端缺口标记法(TUNEL)检测内皮细胞凋亡情况。结果 不同浓度 T 细胞培养上清刺激的 HPAEC 都表现出趋化因子随刺激时间延长而释放增加的趋势,72 h 后  $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^0$  T 细胞中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1, ng/ml)分别为  $1.240 \pm 0.103$ 、 $4.200 \pm 0.305$ 、 $6.500 \pm 0.500$ ,巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ , ng/ml)分别为  $0.210 \pm 0.015$ 、 $0.287 \pm 0.012$ 、 $0.531 \pm 0.037$ ,正常 T 细胞表达和分泌因子(Rantes, ng/ml)分别为  $1.420 \pm 0.074$ 、 $7.634 \pm 0.630$ 、 $15.700 \pm 1.300$ ,其中 Rantes 表现出早期(6 h)快速释放和后期(12、24、48、72 h)延迟释放的特点。与未经 SEB 作用的对照组相比,超抗原组的 T 细胞从 Transwell 小室上室趋化移动至聚碳酸酯膜的数量(个)显著增多( $86.38 \pm 14.50$  比  $16.50 \pm 2.50$ ,  $P < 0.01$ );与 T 细胞组比较,超抗原组 24 h T 细胞黏附率显著增加[( $15.50 \pm 1.08$ )% 比 ( $1.60 \pm 0.22$ )%,  $P < 0.01$ ],加入 1  $\mu$ g/ml 甲基化 Rantes 组 T 细胞黏附率[( $4.39 \pm 0.66$ )%]较超抗原组显著下降( $P < 0.01$ );黏附到下层 HPAEC 的 T 细胞趋化因子受体 5(CCR5)/CD4 较 100 ng/ml SEB 诱导 3 d 的单个核细胞(PBMC)增加了约 2.5 倍,CCR5/CD8 增加了约 2.8 倍;与正常培养的 HPAEC 组比较,超抗原组 HPAEC 细胞凋亡指数增加[( $32.50 \pm 4.50$ )% 比 ( $3.50 \pm 0.50$ )%,  $P < 0.01$ ]。结论 SEB 活化的 T 细胞增加了对 HPAEC 的趋化和黏附,进一步导致 HPAEC 的损伤;这种趋化作用的增强与 SEB 活化的 T 细胞表面 CCR5 表达上调有关。

**【关键词】** T 淋巴细胞; 超抗原; 肠毒素; 趋化因子受体; 肺动脉内皮细胞

**Induction of injury to endothelium of pulmonary artery due to entero-superantigen by up-regulation of lymphocyte chemokine receptor 5** WU Li-xiang\*, XIAO Zheng-lun, KONG Tian-han. \* Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510620, Guangdong, China  
Corresponding author: WU Li-xiang, Email: wulixiang1973@sina.com

**【Abstract】** Objective To observe the injurious effect of T cell activated by *Staphylococcus enterotoxin B* (SEB) on human pulmonary artery endothelial cell (HPAEC) and explore its possible mechanism. Methods HPAEC was cocultured with SEB-activated T cells supernatant, and the secretion of chemotactic factors from HPAEC was examined. The Transwell inserts was used in chemoattraction assays. After HPAECs were cocultured with T cells and 10 ng/ml SEB for 3 days, HPAEC damage was monitored by microscopy and the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. Results Three kinds of tested chemokines showed a time-dependent increase in all supernatant of HPAEC incubated with different concentrations of T cells. After 72 hours, the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, ng/ml) in  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^0$  T cell supernatant groups was  $1.240 \pm 0.103$ ,  $4.200 \pm 0.305$ ,  $6.500 \pm 0.500$ , respectively, macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , ng/ml) was  $0.210 \pm 0.015$ ,  $0.287 \pm 0.012$ ,  $0.531 \pm 0.037$ , respectively, and Rantes (ng/ml) was  $1.420 \pm 0.074$ ,  $7.634 \pm 0.630$ ,  $15.700 \pm 1.300$ , respectively. Rantes presented a two-phase secretion mode; in early 6 hours it increased swiftly, but relatively slow at 12, 24, 48, 72 hours. T cell adherent to polycarbonate membrane increased after SEB stimulation in superantigen group compared with control group without SEB stimulation ( $86.38 \pm 14.50$  vs.  $16.50 \pm 2.50$ ,  $P < 0.01$ ). When 10 ng/ml SEB activated T cell was cocultured with HPAEC, more of originally suspended cultured T cells adhered to HPAEC monolayer [( $15.50 \pm 1.08$ )% vs. ( $1.60 \pm 0.22$ )%,  $P < 0.01$ ], whereas the cell adhesion ratio decreased markedly in 1  $\mu$ g/ml Met-Rantes group [( $4.39 \pm 0.66$ )%,  $P < 0.01$ ]. FACs test of HPAEC-adherent T cell showed lymphocyte chemokine receptor 5 (CCR5)/CD4 and CCR5/CD8 increased over 2.5 folds and 2.8 folds compared with 100 ng/ml SEB activated T cell. Cell death rate of HPAEC was increased when cocultured with SEB-activated T cell in superantigen group compared with HPAEC normal incubation group [( $32.50 \pm 4.50$ )% vs. ( $3.50 \pm 0.50$ )%,  $P < 0.01$ ]. Conclusion Increased chemoattraction and adherence of SEB-activated T cells to HPAEC could damage HPAEC; this effect was possibly due to up-regulation of CCR5 on T cell.

**【Key words】** T cell; Superantigen; Enterotoxin; Chemokine receptor; Pulmonary artery endothelial cell

近年金黄色葡萄球菌(金葡菌)所致脓毒性休克发病率逐渐增加,已成为临床重症患者的主要致病因素,病死率超过 50%<sup>[1]</sup>。金葡菌主要产生肠毒素,具有超抗原(SAg)特性,即一般不需要抗原呈递细胞加工处理,与 T 淋巴细胞受体(TCR)的 V $\beta$  区结合来激活初始 T 淋巴细胞(T 细胞),这些活化的 T 细胞很可能启动了全身炎症的级联反应,在金葡菌脓毒症发病中起重要作用<sup>[2]</sup>。在金葡菌重症肺炎和脓毒症发病机制研究中,都显示与 SAg 相关,并表现为内皮损伤的肺毛细血管渗漏引起的肺水肿<sup>[2-3]</sup>。本课题组前期研究发现,葡萄球菌肠毒素 B(SEB)诱导的 T 细胞在发生经典超抗原增殖现象前即伴随 T 细胞趋化因子受体的上调表达<sup>[4]</sup>。本研究中进一步观察 SEB 活化的 T 细胞对人肺动脉内皮细胞(HPAEC)的损伤作用,并初步探讨其损伤机制。

## 1 材料与方法

**1.1 SEB 诱导单个核细胞(PBMC)分泌的细胞因子对 HPAEC 趋化因子分泌的影响:**分离、收集健康成人外周血 PBMC<sup>[4]</sup>;按  $1 \times 10^6$  个/ml 细胞密度接种于细胞培养皿,加入终浓度 10 ng/ml 的 SEB,培养 72 h 后收集无细胞的上清液,加入 RPMI 1640 细胞培养液按比例稀释后待用。接种 HPAEC 于 96 孔板,37 °C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,待 90%融合后,加入  $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^0$  浓度的 T 细胞上清;对照组仅加入终浓度 10 ng/ml 的 SEB。于 6、12、24、48、72 h 采用双抗夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HPAEC 上清中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )、正常 T 细胞表达和分泌因子(Rantes)的表达,按试剂盒说明书操作。

**1.2 SEB 激活的 T 细胞对 HPAEC 的趋化作用:**  
①准备混合细胞培养上清:接种 HPAEC 于 24 孔板,待细胞生长至 90%融合后,加入  $2 \times 10^6$  个/ml PBMC 和 10 ng/ml SEB 共培养 3 d 后收集无细胞

的上清待用。②Transwell 趋化试验<sup>[5]</sup>:按表 1 方法分组处理。光镜下每室随机选取 5 个视野计数穿过小室底膜的细胞数,计算每个视野的平均细胞数,每组平行设 3 个滤膜。

**1.3 T 细胞与内皮细胞(EC)间黏附的观察<sup>[6]</sup>:**在消化、传代的 HPAEC 中加入  $1 \times 10^6$  个/ml PBMC 混合培养作为 T 细胞组;在培养好的细胞中加入终浓度 10 ng/ml 的 SEB 作为超抗原组;在超抗原组中加入 1  $\mu$ g/ml 甲基化 Rantes (Met-Rantes) 作为 Met-Rantes 组。取培养基,计算 T 细胞数。黏附率 =  $(2 \times 10^6 - \text{收集的非黏附细胞数}) / (2 \times 10^6) \times 100\%$ 。使用胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)消化黏附细胞,加入 300  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液(PBS),制备成细胞悬液,用流式细胞仪检测 T 细胞趋化因子受体 5(CCR5)/CD4、CCR5/CD8,按试剂盒说明书操作。

**1.4 EC 凋亡检测:**将 HPAEC 分 6 组,未予任何处理的 HPAEC 为对照组;终浓度 10 ng/ml SEB 加入 HPAEC 培养液中为 SEB 组; $1 \times 10^6$  个/ml PBMC 与 HPAEC 混合培养为 T 细胞组;终浓度 10 ng/ml SEB 加入  $1 \times 10^6$  个/ml PBMC 混合培养 3 d 为超抗原组;终浓度 10 ng/ml SEB 加入  $1 \times 10^6$  个/ml PBMC 培养 3 d,收集细胞上清液,加入 HPAEC 培养为上清组;超抗原组中加入 1  $\mu$ g/ml Met-Rantes 为 Met-Rantes 组。将培养好的细胞爬片用 PBS 洗去残余培养液,用 4%甲醛溶液室温固定,PBS 室温洗涤,按照试剂盒说明书步骤采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)和 4,6-二氨基-2-苯基吡啶染色(DAPI 染色)对细胞进行染色,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。每次实验均设阴性对照,以核苷酸混合液替代 TUNEL 混合液。在荧光显微镜下随机取 6 个不重叠视野分析结果,蓝色细胞核内绿色颗粒为凋亡细胞,凋亡指数(AI) = TUNEL 阳性细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ 。

表 1 Transwell 趋化试验分组及处理方法

组别	上室(150 $\mu$ l)	下室(600 $\mu$ l)
超抗原组	10 ng/ml SEB 刺激 3 d 的 PBMC( $4 \times 10^6$ 个/ml)	10 ng/ml SEB 刺激的 PBMC( $1 \times 10^6$ 个/ml)与 HPAEC 混合培养上清
趋化因子组	新鲜分离的 PBMC( $4 \times 10^6$ 个/ml)	10 ng/ml SEB 刺激的 PBMC( $1 \times 10^6$ 个/ml)与 HPAEC 混合培养上清
Met-Rantes 组	10 ng/ml SEB 刺激 3 d 的 PBMC( $4 \times 10^6$ 个/ml)加入 1 $\mu$ g/ml Met-Rantes	10 ng/ml SEB 刺激的 PBMC( $1 \times 10^6$ 个/ml)与 HPAEC 混合培养上清
趋化因子受体组	10 ng/ml SEB 刺激 3 d 的 PBMC( $4 \times 10^6$ 个/ml)	HPAEC 的培养上清
对照组	新鲜分离的 PBMC( $4 \times 10^6$ 个/ml)	HPAEC 的培养上清

注, Met-Rantes, 甲基化正常 T 淋巴细胞表达和分泌因子, SEB, 葡萄球菌肠毒素 B, PBMC, 单个核细胞, HPAEC, 人肺动脉内皮细胞

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.04.006 基金项目: 英东重症医学科研基金(303001021)

作者单位: 510620 广东广州, 暨南大学附属第一医院 ICU(吴礼襄), 广州呼吸疾病研究所(萧正伦), 广州医学院蛇毒研究所(孔天翰)

通信作者: 吴礼襄, Email: wulixiang1973@sina.com

1.5 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件进行资料分析,数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对数据先进行正态检验和方差齐性检验,符合正态分布、方差齐者用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 趋化因子变化比较(表 2):单独应用 SEB 刺激的 HPAEC 表现出 MCP-1 释放随时间延长而增加;MIP-1 $\alpha$ 、Rantes 在 72 h 内无显著变化。相反,不同浓度 T 细胞培养上清液刺激的 HPAEC 都表现出趋化因子随刺激时间延长而增加释放,其中 Rantes 表现出早期(6 h)快速释放和后期(12、24、48、72 h)延迟释放的特点。与对照组相比,1 $\times 10^0$  T 细胞组各时间点 MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、Rantes 释放均增加,以 MCP-1、Rantes 的增加尤为显著(均  $P < 0.01$ );MCP-1 在 6 h 和 72 h 分别增加了约 16.4 倍和 20.4 倍;Rantes 在 6 h 和 72 h 分别增加了约 30.6 倍和 134.3 倍。比较不同浓度 T 细胞上清与 HPAEC 趋化因子释放的量效关系可以看到,MCP-1、Rantes 的释放均随 T 细胞上清中细胞因子浓度的增加而增加,即使将 T 细胞上清稀释 100 倍,MCP-1、Rantes 这两种趋化因子的释放在各时间点也比单独应用 SEB 刺激的 HPAEC 显著增加;MIP-1 $\alpha$  水平在 1 $\times 10^{-2}$  T 细胞组与对照组间 24 h 内无明显差别,但在 48 h 和 72 h 均较对照组释放显著增高(均  $P < 0.01$ )。

2.2 T 细胞的趋化作用(彩色插页图 1):与未经 SEB 作用的对照组相比,趋化因子组上室的 T 细胞趋化因子受体没有上调,下室的 HPAEC 上清因受到 SEB 活化 T 细胞趋化因子的刺激而具有较高含量的趋化因子,T 细胞从上室趋化移动至聚碳酸酯膜的数量(个)显著增多(71.00±6.13 比 16.50±2.50,  $P < 0.01$ );趋化因子受体组上室的 T 细胞趋化因子受体上调,下室的 HPAEC 上清 T 细胞趋化因子却无增加,向下室趋化的 T 细胞数量(个)也显著增多(50.88±6.56 比 16.50±2.50,  $P < 0.01$ );超抗原组上室的 T 细胞趋化因子受体上调,下室的 HPAEC 上清 T 细胞趋化因子也增加,T 细胞趋化作用增加最为显著(86.38±14.50 比 16.50±2.50,  $P < 0.01$ )。Met-Rantes 组向下室趋化 T 细胞数量[(42.38±6.67)个]较超抗原组下降( $P < 0.01$ ),但仍较对照组增加( $P < 0.01$ )。

2.3 T 细胞与 HPAEC 的黏附作用(彩色插页图 2):镜下可观察到超抗原组原来悬浮生长的 T 细

表 2 不同浓度 T 细胞对人肺动脉内皮细胞培养上清中趋化因子的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	样本数	MCP-1 (ng/ml)	MIP-1 $\alpha$ (ng/ml)	Rantes (ng/ml)
对照组	6 h	3	0.069±0.006	0.064±0.005	0.114±0.007
	12 h	3	0.063±0.005	0.063±0.003	0.120±0.009
	24 h	3	0.301±0.013	0.091±0.008	0.119±0.011
	48 h	3	0.293±0.011	0.075±0.010	0.117±0.005
	72 h	3	0.303±0.008	0.070±0.006	0.116±0.012
1 $\times 10^{-2}$ T 细胞组	6 h	3	0.300±0.022 <sup>ac</sup>	0.088±0.006 <sup>b</sup>	0.805±0.056 <sup>ac</sup>
	12 h	3	0.507±0.027 <sup>ac</sup>	0.063±0.005 <sup>b</sup>	0.451±0.020 <sup>ac</sup>
	24 h	3	0.840±0.042 <sup>ac</sup>	0.090±0.007 <sup>b</sup>	0.684±0.046 <sup>ac</sup>
	48 h	3	1.011±0.079 <sup>ac</sup>	0.230±0.011 <sup>ab</sup>	0.810±0.062 <sup>ac</sup>
	72 h	3	1.240±0.103 <sup>ac</sup>	0.210±0.015 <sup>ab</sup>	1.420±0.074 <sup>ac</sup>
1 $\times 10^{-1}$ T 细胞组	6 h	3	0.905±0.060 <sup>ab</sup>	0.102±0.011 <sup>ac</sup>	1.300±0.150 <sup>ac</sup>
	12 h	3	2.400±0.152 <sup>ab</sup>	0.090±0.005 <sup>ac</sup>	0.800±0.043 <sup>ac</sup>
	24 h	3	2.600±0.120 <sup>ac</sup>	0.140±0.010 <sup>ac</sup>	1.200±0.086 <sup>ac</sup>
	48 h	3	4.100±0.210 <sup>ab</sup>	0.264±0.015 <sup>ab</sup>	6.545±0.404 <sup>ac</sup>
	72 h	3	4.200±0.305 <sup>ab</sup>	0.287±0.012 <sup>ab</sup>	7.634±0.630 <sup>ac</sup>
1 $\times 10^0$ T 细胞组	6 h	3	1.200±0.068 <sup>a</sup>	0.265±0.016 <sup>a</sup>	3.600±0.138 <sup>a</sup>
	12 h	3	3.000±0.170 <sup>a</sup>	0.300±0.082 <sup>a</sup>	0.100±0.220 <sup>a</sup>
	24 h	3	4.210±0.098 <sup>a</sup>	0.455±0.026 <sup>a</sup>	5.142±0.380 <sup>a</sup>
	48 h	3	4.600±0.208 <sup>a</sup>	0.450±0.020 <sup>a</sup>	12.400±0.860 <sup>a</sup>
	72 h	3	6.500±0.500 <sup>a</sup>	0.531±0.037 <sup>a</sup>	15.700±1.300 <sup>a</sup>

注,MCP-1,单核细胞趋化蛋白-1,MIP-1 $\alpha$ ,巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ , Rantes,正常 T 细胞表达和分泌因子;与对照组同期比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 1 $\times 10^0$  T 细胞组同期比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$

胞随共培养时间延长,黏附至下层的 HPAEC 数量不断增加,伴随 EC 脱落细胞间隙扩大。与 T 细胞组比较,超抗原组 24 h T 细胞黏附率的增加近 10 倍,差异有统计学意义[(15.50±1.08)%比(1.60±0.22)%,  $P < 0.01$ ];与超抗原组比较,Met-Rantes 组 T 细胞黏附率显著下降[(4.39±0.66)%,  $P < 0.01$ ]。用胰蛋白酶处理黏附 T 细胞并用流式细胞仪检测 T 细胞 CCR5 的表达,可以发现黏附到下层 HPAEC 的 T 细胞 CCR5/CD4 占 CD4 的(52.30±4.45)%,CCR5/CD8 占 CD8 的(48.05±3.66)%。与趋化试验中 100 ng/ml SEB 诱导 3 d 的 PBMC 相比,CCR5/CD4 增加了约 2.5 倍[(52.30±4.45)%比(14.80±1.02)%],CCR5/CD8 增加了约 2.8 倍[(48.05±3.66)%比(12.60±1.31)%]。

2.4 黏附 T 细胞对 HPAEC 的损伤作用(彩色插页图 3):荧光显微镜下,对照组正常培养的 HPAEC 很少发生凋亡,AI 为(3.50±0.50)%,超抗原组 AI [(32.50±4.50)%]较对照组明显增加( $P < 0.01$ );部分视野下,可发现凋亡的 HPAEC 细胞旁有小细胞核的 T 细胞黏附。与对照组相比,SEB 组、T 细胞组 AI [(5.25±1.25)%、(4.66±1.33)%]无改变;

上清组 AI $(5.25 \pm 1.25)\%$ 虽有增加,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Met-Rantes 组 AI $(10.33 \pm 0.66)\%$ 较超抗原组明显下降( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

TCR 特异亚型 T 细胞在 SA<sub>g</sub> 刺激后的增殖现象是经典超抗原理论的观点,已证实中毒性休克综合征(TSS)患者后期伴有外周血 TCR 的漂移增殖<sup>[7]</sup>,但在金葡菌脓毒症患者中未证实这一现象<sup>[8]</sup>。由于 T 细胞增殖是 SA<sub>g</sub> 刺激后的晚期事件,大多学者认为,SA<sub>g</sub> 参与脓毒症的发病不是由于 T 细胞增殖的效应,而是由于 SA<sub>g</sub> 激活 T 细胞后释放细胞因子引起炎症级联反应所致<sup>[2]</sup>。这种“炎症介质病”学说否定了 T 细胞在脓毒症炎症发展中的直接作用,现已认识到 T 细胞在急性非特异炎症如缺血/再灌注损伤等病理生理过程中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>,而不作为旁观细胞。实际上,脓毒症的炎症本质是细胞因子和炎性细胞组成的复杂炎症网络反应,因此,从炎症介质、炎性细胞及组织细胞的相互关系上去研究脓毒症炎症本质更为合理。

本课题组前期的实验发现,T 细胞在 SEB 活化后不仅表现为大量的细胞因子释放和 TCR 特异亚型 T 细胞增殖,其细胞表面的趋化因子受体也发生显著改变,显示 T 细胞活化后必然表现出趋化行为改变,提示它可能通过趋化作用分布到感染部位,作为非特异炎性细胞参与组织器官的炎症过程。虽然对肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )到底来自 T 细胞还是抗原呈递细胞仍有争议,但体外研究表明,TNF- $\alpha$  和  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )的共同刺激而不是其中任何一种细胞因子的刺激,可以激活 HPAEC 大量分泌释放 Rantes、MIP- $\beta$ 、IFN- $\gamma$  诱导的 T 细胞  $\alpha$  亚族趋化因子(I-TAC)等 T 细胞趋化因子<sup>[11-13]</sup>,而这两种细胞因子已被证实可以在 SEB 活化 T 细胞过程中大量产生。因此我们有理由推测,SA<sub>g</sub> 刺激后的 T 细胞一方面通过上调 T 细胞趋化因子受体表达,另一方面通过细胞因子信号促进肺动脉内皮细胞(PAEC)释放 T 细胞趋化因子,增强 T 细胞向 EC 的趋化,这个趋化过程可能会造成内皮与 T 细胞间的进一步“对话”,导致 EC 激活或损伤。

本实验中将 10 ng/ml SEB 刺激 3 d 的 T 细胞上清加到 90%贴壁的 HPAEC 中共培养,可观察到 MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、Rantes 3 种趋化因子释放增加,其中 MCP-1、Rantes 不仅与 T 细胞上清浓度呈剂量相关性,且随刺激时间延长释放增加;MIP-1 $\alpha$  释放与细胞因子刺激浓度关系没有那么密切,主要是随

刺激时间的延长而增加。目前已知 Rantes 对 T 细胞和单核细胞具有强大的趋化作用,而 Met-Rantes 能与 T 细胞膜表面的 CCR5/CCR3 结合,但失去了趋化活性,是 Rantes 的特异性拮抗剂,将其加入到 Transwell 侵袭小室中,可显著减少 SEB 活化后 T 细胞对 EC 的趋化和黏附,表明趋化作用与 T 细胞表达 CCR5 及 PAEC 分泌 Rantes 密切相关。

多项研究提示,血管 EC 的凋亡可以直接导致血管内皮完整性的破坏,进而引起肺血管通透性增高,肺水肿加重,因此 EC 凋亡也是急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)肺损伤的重要原因<sup>[14-15]</sup>。本实验发现,肺动脉内皮的损伤与 SEB 活化后的 T 细胞趋化黏附至 EC 密切相关。与单纯的 T 细胞上清相比,在培养的 HPAEC 中加入 SEB 活化后的 T 细胞,其 EC 的凋亡比例增加,细胞脱落增加,这种由于超抗原活化后的 T 细胞直接黏附造成 EC 损伤的现象也见于 Brogan 等<sup>[6]</sup>的报道。

综上,总结本实验的初步结果发现:SEB 通过超抗原机制活化 T 细胞后,T 细胞表现出经典超抗原理论认为的特异性增殖、细胞因子释放,同时也表现出规律性的趋化因子受体表达改变,其中 CCR5 的上调尤为突出;正常 EC 在 SEB 活化后 T 细胞释放的细胞因子信号作用下可进一步呈现炎症激活改变,释放 T 细胞趋化因子 Rantes、MCP-1 等,这些趋化因子与 SEB 活化后 T 细胞膜上的 CCR5 结合增强了 T 细胞向内皮的趋化;SEB 活化后的 T 细胞可以通过直接趋化黏附到 EC 造成内皮损伤;通过拮抗 T 细胞向内皮的趋化可以减少内皮损伤和激活,提示拮抗 T 细胞趋化作用可以作为 SA<sub>g</sub> 相关脓毒症防治的途径。

### 参考文献

- [1] 姚咏明,盛志勇.内毒素与革兰阳性菌致病因子的协同效应与意义.中国危重病急救医学,2005,17,193-196.
- [2] Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. Clin Exp Immunol, 2003, 133, 299-306.
- [3] Schlievert PM. Cytolysins, superantigens, and pneumonia due to community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus. J Infect Dis, 2009, 200, 676-678.
- [4] 吴礼襄,萧正伦.超抗原肠毒素 B 对 T 淋巴细胞趋化因子受体表达的影响及意义.广东医学,2010,31,3178-3181.
- [5] Schreiber TH, Shinder V, Cain DW, et al. S hear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T-cell transmigration, implications for locomotion and the multistep paradigm. Blood, 2007, 109, 1381-1386.
- [6] Brogan PA, Shah V, Klein N, et al. V $\beta$ -restricted T cell adherence to endothelial cells, a mechanism for superantigen-dependent vascular injury. Arthritis Rheum, 2004, 50, 589-597.

[7] Matsuda Y, Kato H, Yamada R, et al. Early and definitive diagnosis of toxic shock syndrome by detection of marked expansion of T-cell-receptor Vβ<sub>2</sub>-positive T cells. Emerg Infect Dis, 2003, 9, 387-389.

[8] Ferry T, Thomas D, Perpoint T, et al. Analysis of superantigenic toxin Vβ T-cell signatures produced during cases of staphylococcal toxic shock syndrome and septic shock. Clin Microbiol Infect, 2008, 14, 546-554.

[9] Miller AC, Rashid RM, Elamin EM. The "T" in trauma, the helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. J Trauma, 2007, 63, 1407-1417.

[10] Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. Transplant Rev (Orlando), 2009, 23, 1-10.

[11] Mazanet MM, Neote K, Hughes CC. Expression of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant by human endothelial cells is cyclosporin A-resistant and promotes T cell adhesion, implications for cyclosporin A-resistant immune inflammation. J Immunol, 2000, 164, 5383-5388.

[12] Luster AD. Chemokines, chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med, 1998, 338, 436-445.

[13] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med, 2006, 354, 610-621.

[14] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. J Leukoc Biol, 2008, 83, 536-545.

[15] Remick DG. Pathophysiology of sepsis. Am J Pathol, 2007, 170, 1435-1444.

(收稿日期:2010-08-18)  
(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

### 血液灌流联合血液透析抢救重度有机磷农药中毒 62 例

钟勇 杨世永 杨芳智 李娟平

【关键词】 血液灌流; 血液透析; 中毒,有机磷农药

本科在常规治疗基础上采用血液灌流(HP)联合血液透析(HD)治疗重度急性有机磷农药中毒(AOPP)疗效显著,报告如下。

#### 1 临床资料

1.1 一般资料:62 例患者中男 25 例,女 37 例;年龄 16~72 岁,平均 44 岁;口服中毒,6 h 内就诊;中毒农药:乐果、敌敌畏、对硫磷、磷胺;其中昏迷 48 例,呼吸衰竭 23 例,肺水肿 15 例,呼吸、心搏骤停 2 例,低血压 9 例。肝功能异常 31 例,肾功能、心肌酶谱异常 40 例。按是否采用血液净化技术分为治疗组(28 例)和对照组(34 例)。两组一般情况比较差异无统计学意义,有可比性。治疗方案均获得患者家属知情同意。

1.2 治疗方法:对照组给予洗胃,尽早使用氯解磷定、阿托品、补液、强心、利尿、抗休克、机械通气、心肺脑复苏等常规治疗。治疗组在对照组基础上给予 HP 联合 HD 治疗,将 HA330 树脂灌流器串联于 F6 透析器前,采用先糖后盐、先低浓度后高浓度肝素盐水的原则预充灌流器,速度约为 100 ml/min,后调至 180~200 ml/min,高浓度肝素预冲速度

低于 50 ml/min,最后用生理盐水将高浓度肝素盐水排出管路。

1.3 观察指标:患者清醒时间、住院时间、中间综合征发生率及抢救成功率。

1.4 统计学处理:数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验或  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

1.5 结果:治疗组治愈 26 例,2 例死于肺部感染和多器官功能衰竭(MOF),治愈率 92.8%。对照组治愈 25 例,4 例死于呼吸衰竭,5 例死于 MOF,治愈率 73.5%。对照组治愈率明显低于治疗组( $P < 0.05$ )。治疗组患者清醒时间、住院时间均短于对照组[(3.26 ± 1.35) h 比 (12.25 ± 3.54) h; (9.1 ± 1.2) d 比 (14.5 ± 5.3) d],中间综合征发生率明显低于对照组(3.6%比 32.4%,均  $P < 0.05$ )。

#### 2 讨论

有机磷农药中毒抑制胆碱酯酶活性,造成乙酰胆碱积聚,引起胆碱能受体活性紊乱,使器官功能发生障碍,严重者可出现脑水肿、MOF 或呼吸衰竭而死亡<sup>[1]</sup>。HP 能清除大分子、脂溶性较高、且易与蛋白质结合的药物和毒物,对由感染或非感染因素引起的机体免疫失衡,各种炎症介质过度释放导致的危重症、全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症、多器官功能障碍综合征(MODS)有

一定疗效<sup>[2-3]</sup>;对重症患者采取 HP 与 HD 交替或同时进行,可全面清除代谢产物、毒素、致病因子以及调节水、电解质与酸碱平衡,防止患者近期与远期并发症,提高抢救成功率<sup>[4]</sup>。本组患者在常规治疗同时尽早使用 HP 联合 HD 治疗,可保护重要器官,缩短病程,减少并发症,提高抢救成功率。治疗过程中要注意患者体温,调整阿托品用量<sup>[5]</sup>;发现过敏反应及时给予地塞米松并停止灌流;如出现低血压可减慢灌流速度,必要时加用升压药;保持血路通畅,严密观察生命体征,严格无菌操作以防感染;适当使用抗凝剂避免出血。

#### 参考文献

[1] 任引津,张寿林.实用急性中毒全书.北京,人民卫生出版社,2003.

[2] 谢后雨,陈海水,孙军,等.血液灌流治疗重度有机磷农药中毒 82 例.中国危重病急救医学,2005,17,610.

[3] 龙承钧,张侨,孙鹤,等.重度急性有机磷农药中毒 29 例救治体会.中国中西医结合急救杂志,2010,17,244.

[4] 李笑宏,焦文建,李明娥.序贯性血液净化治疗严重急性中毒患者疗效观察.中国危重病急救医学,2006,18,565-566.

[5] 张卫红.有机磷农药中毒抢救中阿托品化的指标探讨.中国危重病急救医学,2009,21,684.

(收稿日期:2011-03-13)  
(本文编辑:李银平)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.04.007  
作者单位:402160 重庆市永川区中医院 ICU